

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-143533

(43)Date of publication of application : 23.05.2000

(51)Int.Cl.

A61K 38/23

A61K 9/00

A61K 9/51

A61K 47/36

(21)Application number : 10-317281

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 09.11.1998

(72)Inventor : YAMAMOTO HIROMITSU
TAKEUCHI HIROFUMI
KAWASHIMA YOSHIKI
KUNO YOSHIO

(54) NANOSPHERE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a nanosphere having high overall absorption of calcitonins, imparting durability and useful for the transpulmonary administration by coating a core part of a lactic acid-glycolic acid copolymer with a mucosa-adhesive polymer.

SOLUTION: The objective nanosphere is produced by coating the core part of (A) a lactic acid-glycolic acid copolymer decomposable in vivo and containing calcitonins (e.g. elcatonin) known as a physiologically active peptide with (B) chitosan known as a tackifier polymer and preferably further with (C) a polyvinyl alcohol. Preferably, the copolymer of the component A contains lactic acid and glycol at a ratio of about 0.01:1 to 1:0.01 and has a molecular weight of about 2,000-200,000, the coating amounts of the components B and C are 0.005-5% (W/W) and 0.1-10% (W/W) based on the whole nanosphere, respectively, and the average particle diameter of the nanosphere is $\leq 2,000$ nm.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-143533

(P2000-143533A)

(43) 公開日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード (参考)

A 6 1 K 38/23

A 6 1 K 37/30

4 C 0 7 6

9/00

9/00

V 4 C 0 8 4

9/51

9/51

47/36

47/36

D

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平10-317281

(22) 出願日 平成10年11月9日 (1998.11.9)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年10月7日
発行の「第36回粉体に関する討論会講演論文集」に発表

(71) 出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72) 発明者 山本 浩充

岐阜県岐阜市八代3丁目19番13号

(72) 発明者 竹内 洋文

岐阜県岐阜市栗野西7丁目91番地

(72) 発明者 川島 嘉明

岐阜県岐阜市下土居183番地

(72) 発明者 久野 由雄

岐阜県岐阜市岩崎683番地の2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノスフェア

(57) 【要約】

【課題】 経肺投与用ナノスフェアであり、カルシトニン類の、投与量に対する吸収量の総合的な増加および吸収の持続化により、医療上有用な効果を有するカルシトニン類含有経肺投与用ナノスフェアを提供する。

【解決手段】 カルシトニン類を含有した乳酸・グリコール酸共重合体の核部分をキトサン、必要に応じてポリビニルアルコールとともに被覆した経肺投与用ナノスフェア。

【効果】 カルシトニン類の、投与量に対して総合的に高い吸収率と吸収の持続性を持った、カルシトニン類の経肺投与用製剤が提供でき、このことにより、これまで注射などでしか投与できなかったカルシトニン類が経肺でも投与可能となり、患者のQOLの改善につながる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 経肺投与に用いることを目的としたナノスフェアであって、生理活性ペプチドであるカルシトニン類を含有した生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体の核部分を、粘膜付着性高分子であるキトサンで被覆したナノスフェア。

【請求項2】 経肺投与に用いることを目的としたナノスフェアであって、生理活性ペプチドであるカルシトニン類を含有した生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体の核部分を、粘膜付着性高分子であるキトサン及びポリビニルアルコールで被覆したナノスフェア。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、経肺投与に用いることを目的としたナノスフェアであって、生理活性ペプチドであるカルシトニン類を含有した生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体の核部分を、粘膜付着性であるキトサンの高分子で被覆したナノスフェアに関するものであり、カルシトニン類の吸収性の改善および吸収の持続化により、医療上有用な効果を有するカルシトニン類を含有した経肺投与用のナノスフェアを提供する技術に関する。

【0002】

【従来の技術】医薬の研究の進歩、また遺伝子工学の進歩により、カルシトニン類やインスリンをはじめとする生理活性ペプチドの医薬品としての有用性が示され、また、医療の場での使用頻度が高まって来ている。しかしながら、最も一般的な投与形態である経口での投与を考えた場合、一般にペプチドは水溶性が高く、分子量が大きいため、消化管からの吸収がきわめて低く、また、消化管内での酵素による加水分解を受けやすいために、経口投与によるバイオアベイラビリティはきわめて低い。

【0003】このため、カルシトニン類やインスリンをはじめとするペプチド性医薬品は、現在臨床ではほとんどの場合、注射剤として使用されている。しかし、注射は投与時に疼痛が伴い、また、これらペプチド性医薬品は一般に血中半減期が短いために頻回投与が必要であることが、患者のQOL（生活の質）を低下させている。このため、ペプチド性医薬品の注射剤からの投与経路の変更として、経口投与製剤、経鼻投与製剤、坐剤、経腔剤、経肺投与製剤、点眼剤、およびイオントフォレーシスなどの経皮投与製剤、などを目指した研究が数多くなされている。

【0004】これらの内、経肺投与製剤が近年注目を集めている。肺からの薬物吸収の場となる肺胞は、上皮細胞一層が毛細血管と接しており、その厚みは0.5～1μmと薄く、またその表面積が極めて広い。このため肺

は吸収部位として大きな可能性を秘めている。これまでも、カルシトニンに噴射剤を使用した肺吸収用エアゾール〔特開昭60-161924号公報〕や、カルシトニン類を有効成分として水溶性の基剤を含有した粉末状の経肺投与用組成物〔特開平6-100464号公報〕、ペプチド性薬物とヒアルロン酸を含有した経肺投与用製剤〔特開平9-309843号公報〕、さらには特殊な吸入用器材を用いた各種の経肺投与製剤などが報告されている。

【0005】しかしながら、空気を吸い込む時に末端の肺胞まで薬物を含有した粉末を送り込み、かつ空気を吐き出す時に粉末が呼気と共に戻らず肺胞内に留まり、長時間に渡って薬物を放出させることのできる十分な技術は、未だ完成されていない。一方、近年医薬品の製剤技術に関する研究領域において、生体内分解性高分子を基剤としたコントロールリリース製剤などの研究が数多くなされている。そのうち、すでにかんりの技術が積み重ねられているものに、マイクロカプセル、マイクロスフェアと称されるものがあり、注射剤や経口剤などでの利用が試みられている。これらのなかには、薬物として黄体形成ホルモン放出ホルモン（LH-RH）の誘導体である酢酸リユープロレリンを含み、高分子として乳酸・グリコール酸共重合体を用いた平均粒子径が20～30マイクロメートルのもの〔Chem. Pharm. Bull., vol. 36, 1095-1103, (1988)〕が、既に医薬品として利用されている。

【0006】また最近、ナノカプセル、ナノスフェアと称されるものについての研究も進められている。通常のマイクロカプセル、マイクロスフェアの粒径は、約5～500マイクロメートルであるのに対し、ナノカプセル、ナノスフェアは粒径が、通常約1000ナノメートル以下のものであり、下限としては50ナノメートル程度であるが特に下限を限定するものではない。

【0007】各種のマイクロカプセル、マイクロスフェアの製造法については、すでに数多くの開示があり〔特開平1-216918号公報〕、また、ナノスフェア、ナノカプセルの製造法についても、既にいくつかの技術が開示されている〔特開平5-58882号公報〕。また、天然の高分子であるキチンや、その脱エステル化体であるキトサンについては、近年幅広い分野でその利用についての検討がなされており、医薬の分野においても、創傷の治癒に関する効果や、製剤の基剤としての利用について研究がなされている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明はカルシトニン類を含有した経肺投与用のナノスフェアであって、カルシトニン類の総合的な吸収率（投与量に対する吸収量）が高く、また持続性を付与した、有用な経肺投与用のナノスフェアを提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らはこれまで、生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体やポリ乳酸などを用いたナノスフェアについて、その製造法や医薬品としての有用性について研究を重ねてきている。また一方で、天然の高分子であり、いくつかの興味深い性質を有するキトサンについて、製剤分野での利用について種々検討を重ねてきている。

【0010】これらの検討の結果、既に本発明者らは、生理活性ペプチドの経口投与用製剤の分野において、生理活性ペプチドであるエルカトニンを含む、生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体からなるナノスフェアを核部分とし、これを消化管粘膜付着性高分子の一つであるキトサンで被覆することにより、経口投与時の消化管からの吸収が向上し、また持続化した経口投与用ナノスフェアが得られることを見だし、さらに消化管粘膜付着性高分子とともにポリビニルアルコールで被覆することにより好適な経口投与用ナノスフェアが得られることを見だし、報告している〔第14回・製剤と粒子設計シンポジウム講演要旨集 P. 121～126 (1997)、特願平9-283473号明細書：平成9年10月16日出願日〕。

【0011】本発明者らは、経口投与とは全く別の分野である経肺投与の分野において、さらに検討を重ねた結果、キトサンで被覆したカルシトニン類の一種であるエルカトニンを含むナノスフェアを肺に投与した場合、エルカトニンの総合的な吸収率（投与量に対する吸収量）が向上し、また持続性を示すことを見だし、本発明を完成した。

【0012】即ち、本発明は、経肺投与用のナノスフェアであって、生理活性ペプチドであるカルシトニン類を含む生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体の核部分を粘膜付着性高分子であるキトサンで被覆したナノスフェア、及び、生理活性ペプチドであるカルシトニン類を含む生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体の核部分を粘膜付着性高分子であるキトサン及びポリビニルアルコールで被覆したナノスフェアを提供するものである。

【0013】本発明に用いられる生体内分解性ポリマーとは、生体内で分解・消失する性質を有する高分子であり、生理活性を持たないポリマーであり乳酸・グリコール酸共重合体である。乳酸・グリコール酸共重合体としては、乳酸とグリコール酸を約0.01:1～1:0.01、好ましくは1:5～10:1、さらに好ましくは1:1～6:1の比率で含む、分子量約2000～200000、好ましくは5000～150000、さらに好ましくは10000～100000の共重合体である。これらはたとえば、乳酸とグリコール酸をイオン交換樹脂を触媒として弱い減圧下に加熱し、縮合重合させることにより製造される。また適当な市販品も存在する。本発明においては、これらを単独で用いてもよく、

また、数種類を混合して用いてもよい。

【0014】本発明にいう粘膜付着性高分子とは、ヒトを含む哺乳動物の粘膜に付着する性質を有する高分子であり、この付着性は、例えばラットの腸管粘膜を用いた実験などにより容易に確認することができる〔第14回・製剤と粒子設計シンポジウム講演要旨集 P. 121～126 (1997)、特願平9-283473号明細書：平成9年10月16日出願日〕。このような性質を持つ高分子としては、キトサンが挙げられる。

【0015】キトサンは、生体適合性に優れ、生体内分解性を有する天然高分子であり、その面からも好適である。ここでいうキトサンとは、完全に脱エステル化されたキチンを示すものではなく、一部もしくは全てが脱エステル化されたキチンを示す。本発明に用いられるキトサンとしては、分子量約5000～200000のものが挙げられ、20000～100000が好ましく、30000～70000がさらに好ましい。また、その脱エステル化度は約50～100%のものが挙げられ、70～100%が好ましく、80%～100%がさらに好ましい。

【0016】キトサンは、通常、精製キチンを原料として、30～60%の強アルカリ溶液中で、加熱加水分解することによって調製することができる。また既に適当な市販品も存在する。また、本発明に用いられるポリビニルアルコールとしては、重合度約100～5000のものが挙げられ、好ましくは100～3000、さらに好ましくは200～2000のものが挙げられる。また、そのけん化度は、約70～100のものが挙げられ、好ましくは75～95、さらに好ましくは75～90のものが挙げられる。このようなポリビニルアルコールは、ポリ酢酸ビニルの部分もしくは完全加水分解により製造することもできるが、適当な市販品も存在する。

【0017】さらに、本発明に用いられるカルシトニン類としては、ウナギカルシトニン、サケカルシトニン、ヒトカルシトニン、ブタカルシトニン、ニワトリカルシトニンなどの天然型カルシトニンおよびASU1-7ウナギカルシトニン（エルカトニン）、ASU1-7ニワトリカルシトニンなどの半合成カルシトニンが挙げられ、好ましくはエルカトニンである。

【0018】本発明で用いられるナノスフェアの大きさは、平均粒子径として、2000ナノメートル以下であり、好ましくは1000ナノメートル以下であり、さらに好ましくは800ナノメートル以下であり、下限としては50ナノメートル程度である。キトサンのコーティング量は、ナノスフェア全量の0.005～5% (W/W) である。また、ポリビニルアルコールのコーティング量は、ナノスフェア全量の0.1～10% (W/W) である。

【0019】本発明のナノスフェアは、カルシトニン類を含む乳酸・グリコール酸共重合体のナノスフェア

の核部分を公知の方法により調製し、これにキトサンをコーティングしてもよく、核部分のナノスフェアの調製時に、同時にキトサンでコーティングされるような方法により調製してもよい。本発明のナノスフェアの製造工程のうち、キトサンによるコーティングを行う工程においては、凍結乾燥時のナノスフェアの凝集を抑制し、また凍結乾燥後の再分散性の優れたナノスフェアを得る目的から必要に応じポリビニルアルコールなどの高分子を併用してもよく、好ましくはキトサンとポリビニルアルコールを併用して同時にコーティングした方がよい。

【0020】本発明のナノスフェアの基本的な調製法の例として、「油中溶媒拡散法」と「水中溶媒拡散法」の概略を以下に示すが、本発明はナノスフェアの調製法として、この2つの方法のみにとらわれるものではない。「油中溶媒拡散法」では、まず、脂肪酸グリセリドなどの脂質、*n*-ヘキサンなどの第1の有機溶媒、及び第1の乳化剤を混合し、溶解した外相<A>を調製する。一方、乳酸・グリコール酸共重合体、カルシトニン類、及び第2の乳化剤を第2の有機溶媒に溶解した内相を調製する。外相<A>中に攪拌下、内相をペリスターポンプなどを用いて、ゆっくりと滴下する。次に、加温減圧下、数時間にわたり攪拌を続け、ナノスフェアを生成させる。得られたナノスフェアの懸濁液について、必要に応じ第1の有機溶媒を加えたのち、遠心分離を行い、上澄み液を除去する。さらに必要に応じ、粒子表面の脂質を除去するために第1の有機溶媒を加えて再懸濁し、遠心分離後、上澄み液を除去する操作を繰り返す。

【0021】得られたペレットを乾燥し、これをキトサン、および必要に応じポリビニルアルコールを併せて溶解した水系溶液（水溶液、各種の緩衝液溶液）中に分散させる。その後、遠心分離、上澄み液を除去後、ペレットを水に再懸濁する。得られた懸濁液を凍結乾燥することにより、カルシトニン類を封入し、かつキトサンで、またはキトサンとポリビニルアルコールでコーティングしたナノスフェアを得ることができる。

【0022】外相<A>に用いる脂質とは、乳酸・グリコール酸共重合体及びカルシトニン類を溶かしにくい性質を持つ単純脂質であり、例としては、大豆油、ゴマ油、ヒマシ油、コーン油、綿実油などの植物油、脂肪酸グリセリドなどが挙げられ、これらの2種以上を混合して用いてもよい。また、これらの脂質の代わりに、流動パラフィンやシリコンオイルを用いてもよい。

【0023】第1の有機溶媒は、用いる脂質を溶かしやすく、且つ乳酸・グリコール酸共重合体及びカルシトニン類を溶かしにくい溶媒であり、例えば*n*-ヘキサン、*n*-ヘプタンなどである。外相<A>は、上記の脂質または第1の有機溶媒を単独で用いてもよいが、好ましくは、脂質と第1の有機溶媒を混合して用いた方がよく、さらに好ましくは、中鎖脂肪酸トリグリセリドと*n*-ヘ

キサンなどを混合して用いるのがよい。

【0024】内相に用いる第2の有機溶媒は、乳酸・グリコール酸共重合体及びカルシトニン類を溶かしやすく、第1の有機溶媒に溶け込む性質を持ち、且つ第1の有機溶媒より低沸点の有機溶媒である。溶媒の沸点としては、約120℃以下、好ましくは100℃以下、さらに好ましくは約30～80℃である。例としては、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、アセチルアセトン、テトラヒドロフラン、ジオキサン等であり、またこれらの2種以上の混合溶媒であってもよい。

【0025】第1及び第2の乳化剤は、それぞれの溶媒に溶解するものの中から、適当なものを選ぶことができる。第1の乳化剤は、条件によっては無くてもよい。乳化剤の例としては、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体などの非イオン性界面活性剤、レシチンなどが挙げられる。これらの乳化剤は2種以上を混合して用いてもよい。好ましくは、それぞれ非イオン性界面活性剤を用いるのがよい。

【0026】外相<A>と内相の混合比率は、内相1重量部当たり、外相<A>0.1～100重量部である。また、乳酸・グリコール酸共重合体の内相中の濃度は、ポリマーの種類や分子量、第2の有機溶媒の種類によって異なるが、0.1～20% (w/w) である。また、カルシトニン類の乳酸・グリコール酸共重合体に対する割合は、カルシトニン類の種類や目的とする吸収量及び持続時間により異なるが、0.05～20% (w/w) である。

【0027】また、キトサンの水系溶液中の濃度は、キトサンの分子量によっても異なるが、0.02～0.1% (w/w) である。また、ポリビニルアルコールの水系溶液中の濃度は、0.3～3% (w/w) である。また、乳化剤の使用の際の濃度は、0.05～10% (w/w) である。攪拌は、通常マグネティックスターラーなど緩和な条件で行うが、必要ならば高速ホモジナイザーなどを用いてもよい。

【0028】また、調製したナノスフェアの単離は、上記に示したような凍結乾燥の他、超遠心分離や透析などにより行うことができる。また、上記に示した内相に代えて、例えばW/O型エマルジョンを内相として用いてナノスフェアを調製してもよい。即ち、乳酸・グリコール酸共重合体と乳化剤をクロロホルム、ジクロロメタン、ジクロロエタン、トリクロロエタンなどの揮発性有機溶媒に溶解し、これに、カルシトニン類を、例えば水溶液、各種緩衝液などの水系溶媒に溶解したものを加え、ホモジナイザーなどを用いてW/O型エマルジョンを調製し、これを上記の内相として用

いてもよい。

【0029】「水中溶媒拡散法」では、キトサン、および必要に応じポリビニルアルコールを併せて溶解した水系溶液（水溶液、各種の緩衝液溶液）を外相＜C＞として調製する。一方、乳酸・グリコール酸共重合体及びカルシトニン類を有機溶媒に溶解した内相＜D＞を調製する。なお、内相＜D＞には、必要に応じて、適当な乳化剤を添加してもよい。外相＜C＞中に攪拌下、内相＜D＞をペリスターポンプなどを用いて、ゆっくりと滴下する。必要に応じ、加温減圧下、数時間にわたり攪拌を続け、ナノスフェアを生成させる。得られたナノスフェアの懸濁液を遠心分離し、上澄み液を除去、さらに必要に応じ洗浄操作を加えた後、得られたペレットを水に再懸濁させ、これを凍結乾燥することにより、カルシトニン類を封入し、かつキトサンで、またはキトサンとポリビニルアルコールでコーティングした、ナノスフェアを得ることができる。

【0030】内相＜D＞に用いる有機溶媒は、乳酸・グリコール酸共重合体及びカルシトニン類を溶かしやすく、揮発性かつ水混和性の有機溶媒である。水に対する溶解度は約80%以上であり、90%以上が好ましく、完全混和性のものがさらに好ましい。溶媒の沸点は、約120℃以下であり、100℃以下が好ましく、約30～80℃がさらに好ましい。例としては、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、アセチルアセトン、テトラヒドロフラン、ジオキサン等であり、またこれらの2種以上の混合溶媒であってもよい。

【0031】外相＜C＞と内相＜D＞の混合比率は、内相＜D＞1重量部当たり、外相＜C＞1～100重量部である。また、乳酸・グリコール酸共重合体の内相＜D＞中の濃度は、ポリマーの種類や分子量、有機溶媒の種類によって異なるが、通常0.01～50%（w/w）、好ましくは0.1～20%（w/w）である。また、カルシトニン類の乳酸・グリコール酸共重合体に対する割合は、ペプチドの種類や目的とする吸収量及び持続時間により異なるが、0.05～20%（w/w）である。また、キトサンの外相＜C＞中の濃度は、キトサンの分子量によっても異なるが、0.2～0.6%（w/w）である。また、ポリビニルアルコールの外相＜C＞中の濃度は、1～3%（w/w）である。

【0032】内相＜D＞に必要に応じて添加してもよい乳化剤の例としては、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体などの非イオン性界面活性剤、レシチンなどが挙げられる。これらの乳化剤は2種以上を混合して用いてもよい。好ましくは、非イオン性界面活性剤を用いるのがよい。また、乳化剤の使用の際

の濃度は、0.05～10%（w/w）が好ましい。

【0033】攪拌は、通常マグネティックスターラーなど緩和な条件で行うが、必要ならば高速ホモナイザーなどを用いてもよい。また、調製したナノスフェアの分離は、上記に示したような凍結乾燥の他、超遠心分離や透析などにより行うことができる。本発明のナノスフェアは、その含有する生理活性ペプチドを薬効成分とした経肺投与型の医薬品として利用できる。その際、粉末として投与する場合には、本発明のナノスフェアのみを用いて、スピンヘラー、ロータヘラー等の適当な粉末吸入器を用いて投与してもよく、また必要に応じて、医薬品として許容できる各種の添加剤を加えて投与用の粉末を調製し、これを適当な粉末吸入器を用いて投与してもよい。

【0034】また、精製水、生理食塩水、医薬品として許容できる緩衝液、グリセリン、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール及びこれらの任意な混合溶液等に分散・懸濁させ、それを適当なネブライザー等の吸入器を用いて投与してもよい。この場合、医薬品として許容できる適当な等張化剤、pH調整剤、増粘剤などの添加剤を加えてもよい。さらに噴出用ガス、例えばフロン11、フロン12等を用いて、常法により経肺投与してもよい。

【0035】本発明によるナノスフェアの経肺投与における、カルシトニン類の肺からの吸収改善、及びまたは、吸収の持続化のメカニズムは以下のように推測される。但し本発明は、下記に示すメカニズムによって限定されるものではない。薬物を吸入により肺に投与する場合、大きい粒子は末端の肺胞まで届きにくく、肺胞まで到達させるには、粒径が数ミクロン以下でなければならない。しかしながら、粒子径が小さくなると、吸気と共に末端の肺胞まで入っても、すぐに呼気と共に出てしまう確立が高くなる。また、一旦肺胞に留まったものも一部は徐々に肺胞から呼気中や食道へ排泄される。従って、吸入直後に呼気と共に外に出る量を減らし、さらにその後排泄される量を減らすことができれば、投与した薬物量の内の多くの部分を吸収に関与する肺胞内に留めることができる。さらに薬物吸収の場である肺胞内部表面に粒子を積極的に付着させ、かつその粒子から持続的に薬物を放出させることができれば、吸収性が良好でかつ持続的な製剤ができると考えられる。

【0036】本発明によるナノスフェアは、まさに、粘膜付着性高分子であるキトサンでナノスフェアをコーティングすることにより、ナノスフェアが肺胞粘膜に付着し、そこから持続的にカルシトニン類を徐々に溶出することにより投与量に対する吸収量の総合的な増加、及び吸収の持続化を示したものと考えられる。更に別の要因としては、溶出したカルシトニン類の近傍にキトサンの高分子が存在し、これがカルシトニン類の、肺粘膜に存在するペプチド分解酵素による分解を阻害し、これによ

って吸収量が増加し、かつ持続化していることも可能性として考えられる。

【0037】

【発明の実施の形態】以下に、実施例、参考例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。更に実験例を挙げて、本発明製剤の効果を具体的に示す。なお、以下の実施例において、乳酸・グリコール酸共重合体はPLGAと略す。。

【0038】

【実施例1】(キトサンでコーティングしたエルカトニン封入PLGA(75:25)ナノスフェアの調製)ポリリシノール酸ヘキサグリセリル(Hexaglyln PR-15;日光ケミカルズ社製)を2%含有するトリ(カプリル・カプリン酸)グリセリル(トリエスターF810;日光ケミカルズ社製)60mlを調製し、さらにn-ヘキサン40mlを混合溶解し外相を調製した。次に、ソルビタンモノオレート(Span80;キシダ化学社製)100mg、PLGA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製)100mg、エルカトニン(旭化成工業社製)2mgをアセトン3mlとメタノール2mlの混合溶媒中に溶解した溶液を外相溶液の攪拌下、ペリスターポンプを用いて2ml/minの速度で滴下した。

【0039】ついで35℃にて減圧下3時間攪拌を続け、得られた懸濁液にn-ヘキサン20mlを加え、遠心操作(20000rpm、4℃、10分間)を行った。遠心操作後、上清を除去し、n-ヘキサンを加えて再懸濁させ、再度遠心操作を行った。遠心操作後、上清を除去し、沈殿物を乾燥し、これを1%ポリビニルアルコール(PVA-403、クラレ社製)の水溶液20mlと1%キトサン(平均分子量50000、板角社製)溶液(溶媒:0.05M酢酸緩衝液、pH4.4)1mlを混合した溶液中に分散させた。分散後、遠心操作を行い、上清を除去した後、沈殿物を精製水に再懸濁させた。得られた懸濁液を凍結乾燥して、経肺投与用としてのキトサンでコーティングしたエルカトニン封入PLGA(75:25)ナノスフェア粉末87.2mg(エルカトニン含有量1.26mg)を得た。

【0040】

【参考例1】(エルカトニン封入PLGA(75:25)ナノスフェアの調製)実施例1において、キトサンを除いた以外同様にして、エルカトニン封入PLGA(75:25)ナノスフェア粉末87.2mg(エルカトニン含有量1.24mg)を得た。

【0041】

【参考例2】(ビレン封入PLGA(75:25)マイクロスフェア(平均粒子径12.5μm)の調製)ポリマーとしてポリビニルアルコール(PVA-403、クラレ社製)1gを使用し、蒸留水50mlに溶解した溶液を外相とし、この外相を400rpmで攪拌下、PL

GA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製)200mg、ビレン(ナカライテスク社製)2mgをアセトン5mlに溶解した溶液をペリスターポンプを用いて2ml/minの速度で滴下した。得られた懸濁液を26.8×g、10min遠心分離し、上清と沈殿物を得た。得られた沈殿物を約10mlの精製水に懸濁させ、凍結乾燥により、ビレン封入PLGA(75:25)マイクロスフェア(平均粒子径12.5μm)粉末69.7mgを得た。粒子径は、ビレン封入PLGA(75:25)マイクロスフェア粉末を精製水に再懸濁させ、レーザー回折式光散乱法(湿式法、LD SA-2400A、東日コンピュータ社製)により測定した。

【0042】

【参考例3】(ビレン封入PLGA(75:25)マイクロスフェア(平均粒子径7.07μm)の調製)参考例2で26.8×g、10min遠心分離し、得られた上清をさらに107.3×g、10min遠心分離し、上清と沈殿物を得た。得られた沈殿物を約10mlの精製水に懸濁させ、凍結乾燥により、ビレン封入PLGA(75:25)マイクロスフェア(平均粒子径7.07μm)粉末36.7mgを得た。粒子径は、ビレン封入PLGA(75:25)マイクロスフェア粉末を精製水に再懸濁させ、レーザー回折式光散乱法(湿式法、LD SA-2400A、東日コンピュータ社製)により測定した。

【0043】

【参考例4】(ビレン封入PLGA(75:25)ナノスフェア(平均粒子径660nm)の調製)参考例3で107.3×g、10min遠心分離し、得られた上清をさらに42931.2×g、10min遠心分離し、上清と沈殿物を得た。得られた沈殿物を約10mlの精製水に懸濁させ、凍結乾燥により、ビレンを封入したPLGA(75:25)ナノスフェア(平均粒子径660nm)粉末81.0mgを得た。粒子径は、ビレン封入PLGA(75:25)ナノスフェア粉末を精製水に再懸濁させ、レーザー回折式光散乱法(湿式法、LD SA-2400A、東日コンピュータ社製)により測定した。

【0044】

【参考例5】(キトサンでコーティングしたビレン封入PLGA(75:25)ナノスフェアの調製)ポリビニルアルコール(PVA-403、クラレ社製)1g、キトサン(平均分子量50000、板角社製)0.2gを0.05M酢酸緩衝液(pH4.4)50mlに溶解した溶液を外相とし、この外相を400rpmで攪拌下、PLGA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製)200mg、ビレン(ナカライテスク社製)2mgをアセトン3mlとエタノール2mlの混合溶媒中に溶解した溶液をペリ

スターポンプを用いて2ml/minの速度で滴下した。ついで35℃にて減圧下3時間撹拌を続け、撹拌後、遠心操作(20000rpm、4℃、10分間)を行った。遠心操作後、上清を除去し、精製水を加えて再懸濁させ、再度遠心操作を行った。遠心操作後、上清を除去し、沈殿物を精製水に再懸濁させた。得られた懸濁液を凍結乾燥し、キトサンでコーティングしたビレン封入PLGA(75:25)ナノスフェア粉末164.6mgを得た。

【0045】

【参考例6】(ビレン封入PLGA(75:25)ナノスフェアの調製) ポリビニルアルコール(PVA-403、クラレ社製)1gを精製水50mlに溶解した溶液を外相とし、この外相を400rpmで撹拌下、PLGA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製)200mg、ビレン(ナカライテスク社製)2mgをアセトン3mlとエタノール2mlの混合溶媒中に溶解した溶液をペリスターポンプを用いて2ml/minの速度で滴下した。ついで35℃にて減圧下3時間撹拌を続け、撹拌後、遠心操作(20000rpm、4℃、10分間)を行った。遠心操作後、上清を除去し、精製水を加えて再懸濁させ、再度遠心操作を行った。遠心操作後、上清を除去し、沈殿物を精製水に再懸濁させた。得られた懸濁液を凍結乾燥し、ビレン封入PLGA(75:25)ナノスフェア粉末186.0mgを得た。

【0046】

【試験例1】(ナノスフェアの粒子径の測定) 実施例1及び参考例1で調製したナノスフェア粉末を精製水中に再懸濁させて、動的光散乱法(LPA3100、大塚電子社製)により粒子径を測定した。また、実施例1で調製したナノスフェアを走査型電子顕微鏡により観察した。

【0047】動的光散乱法により測定した重量平均粒子径は、実施例1が658.4nm、参考例1が522.9nmであった。上記に結果を示した通り、実施例1及び参考例1で調製したナノスフェアの重量平均粒子径は、500nm~700nmであった。また、電子顕微鏡で観察したところ、実施例1のナノスフェアは、球状であり、1000nm以下の粒子径であった。

【0048】

【試験例2】(ナノスフェアのゼータ電位の測定) 実施例1及び参考例1で調製したナノスフェアを蒸留水に懸濁させた後、溶媒(0.1Mの塩酸と0.1Mの水酸化カリウム水溶液を混合して調整した各pHの溶液)に分

散させ、ナノスフェア粒子表面のゼータ電位をゼータ電位計(Zeta master、Malvern Instruments社製)により測定した。

【0049】結果は図1に示した通り、参考例1のナノスフェアに比較して、実施例1のナノスフェアは、ゼータ電位が酸性領域で正の値を示した。このことは実施例1のナノスフェア表面が酸性領域で正の電荷を持つキトサンによってコーティングされていることを示している。

【0050】

【試験例3】(ナノスフェアの肺内到達性評価) ナノスフェアの肺内到達性は、バス型超音波ネブライザー(NE-U07、オムロン社製)を人工肺モデルのカスケードインパクター(アンダーセン ノンバブル サンプラー、MODEL AN200、東京ダイレック)に接続させ、ポンプにより吸引し評価した。

【0051】参考例2、参考例3及び参考例4で調製したビレン封入PLGAマイクロスフェア及びビレン封入PLGANANOSFEAを精製水10mlに分散させて、バス型超音波ネブライザー(NE-U07、オムロン社製)で20分間噴霧し、吸入流速28.3L/minで実施した。噴霧後、ネブライザー、Throat、Stage0(>11.0μm)、Stage1(11.0-7.0μm)、Stage2(7.0-4.7μm)、Stage3(4.7-3.3μm)、Stage4(3.3-2.1μm)、Stage5(2.1-1.1μm)、Stage6(1.1-0.65μm)及びStage7(0.65-0.43μm)に捕集されたビレン封入PLGAマイクロスフェア及びビレン封入PLGANANOSFEA量を蛍光光度分光計(F-3010、日立製作所社製:励起波長337nm、蛍光波長395nm)により測定した。

【0052】ネブライザーに仕込んだビレン封入PLGAマイクロスフェア及びビレン封入PLGANANOSFEAの量に対するネブライザー、Throat及びStage0~7に捕集された量の割合(捕集率)を求め、表2に示した。また、仕込んだビレン封入PLGAマイクロスフェア及びビレン封入PLGANANOSFEAの量に対するネブライザーから排出された量(Throat及びStage0~7に捕集された総量)の割合(噴霧効率)と気管、気管支及び肺へ到達沈着すると仮定されるStage2~6への捕集総量の割合(到達効率)を算出し表1に示し、肺内到達性を評価した。

【0053】

【表1】

カスケードインpakターを用いたPLGAマイクロスフェア及びナノスフェアの各Stageの捕集率、噴霧効率及び到達効率

捕集率 (%) (n = 3, 平均値 ± 標準偏差)				
(μm)	参考例 2	参考例 3	参考例 4	
ナノタイプ	97.8 ± 0.7	86.9 ± 1.1	38.2 ± 9.9	
Throat	1.2 ± 0.9	2.0 ± 1.2	3.2 ± 0.7	
Stage0 > 11.0	0.2 ± 0.0	3.3 ± 2.0	2.3 ± 0.5	
Stage1 11.0 ~ 7.0	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.2	2.9 ± 1.0	
Stage2 7.0 ~ 4.7	0.1 ± 0.1	1.2 ± 0.6	9.8 ± 3.2	
Stage3 4.7 ~ 3.3	0.2 ± 0.1	1.6 ± 1.0	16.8 ± 2.7	
Stage4 3.3 ~ 2.1	0.3 ± 0.2	2.0 ± 0.7	19.3 ± 3.9	
Stage5 2.1 ~ 1.1	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1	2.8 ± 0.2	
Stage6 1.1 ~ 0.65	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.2	2.6 ± 0.6	
Stage7 0.65 ~ 0.43	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.4	2.1 ± 0.2	
噴霧効率 (%)	2.2 ± 0.7	13.1 ± 1.1	61.8 ± 9.9	
到達効率 (%)	0.6 ± 0.5	6.2 ± 2.1	51.3 ± 8.5	

【0054】表1に示した通り、参考例2及び参考例3のPLGAマイクロスフェアに比較して、参考例4のPLGANANOSFEAは、噴霧効率及び到達効率が劇的に上昇し、肺内到達性が著しく向上した。すなわち、平均粒子径が $1\mu\text{m}$ 以下のナノスフェアは、平均粒子径が $7\mu\text{m}$ 以上のマイクロスフェアより経肺投与時に効率的に肺へ到達することが推測された。

【0055】

【試験例4】(ビレン封入PLGANANOSFEAの肺内滞留性評価) Hartley系雄性モルモット(6週令、各3匹)を使用し、参考例5及び参考例6で調製したビレン封入PLGANANOSFEA 30mgを生理食塩水10mlで溶解した溶液をバス型超音波ネブライザーを用いて20分間噴霧し、モルモットの気管内から吸入させた。投与装置は、バス型超音波ネブライザーにチャンバー、さらにレスピレーター(MODEL 683、HARVARD、2.5ml/st. × 80st./min)を接続し、さらに、ペントバルビタールで麻酔したモルモットの気管にY字カニューレを接続した。投与後気管を縫合し、1時間及び4時間後にモルモットを脱血死させ肺を摘出した。摘出した肺からビレン封入PLGANANOSFEAを抽出し、蛍光光度分光計(F-3010、日立製作所社製：励起波長337nm、蛍光波長395nm)により肺に残存するPLGANANOSFEA量を測定した。

【0056】結果は図2に示した通りである。参考例6投与群に比較して、参考例5投与群は、投与直後から高い値を示し、その後の消失も遅かった。すなわち、キ

タンをコーティングしたナノスフェアが肺粘膜上に付着し、肺内に滞留したためと推測された。

【0057】

【試験例5】(エルカトニンを封入したPLGANANOSFEAの経肺吸収性評価) Hartley系雄性モルモット(6週令、各4匹)を使用し、実施例1及び参考例2で調製したエルカトニン封入PLGANANOSFEA 20mgを生理食塩水10mlで溶解した溶液、また、対照としてエルカトニンを生理食塩水で溶解した溶液を100IU/kgの投与量で試験例4と同様に、モルモットの気管内から吸入投与した。投与後、経時的にモルモットの頸静脈から採血し、カルシウムCテストワコー(和光純薬工業社製)にて血漿中カルシウム濃度を測定した。投与前の血漿中カルシウム濃度を100としてカルシウム低下率を算出した。

【0058】結果は図3に示した通りである。エルカトニン溶液投与群及び参考例1投与群に比較して、実施例1投与群は、投与8時間後81%までカルシウム濃度が低下し、強い血漿中カルシウム低下作用を示した。また、投与後24時間においても有意に血漿中カルシウム低下作用が持続した。すなわち、キタンをコーティングしたナノスフェアが肺粘膜に付着し薬物を持続的に放出したためと推測された。これらの結果から、本発明のキタンをコーティングしたエルカトニン含有ナノスフェア製剤は、経肺投与で肺粘膜からエルカトニンの吸収性が改善され、かつ、持続性を有することを示している。

【0059】

【発明の効果】本発明により、カルシトニン類の総合的な利用率（投与量に対する吸収量）が高く、かつ吸収の持続性を持った、カルシトニン類含有ナノスフェアが提供でき、さらにはカルシトニン類の経肺投与用製剤が提供できる。このことにより、これまで注射などでしか投与できなかったカルシトニン類が経肺でも投与可能となり、患者のQOLの改善につながる。

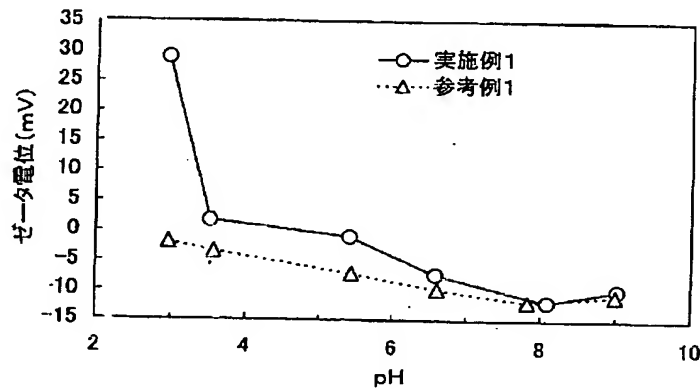
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ナノスフェアのゼータ電位のpHプロファイルを示すものである。

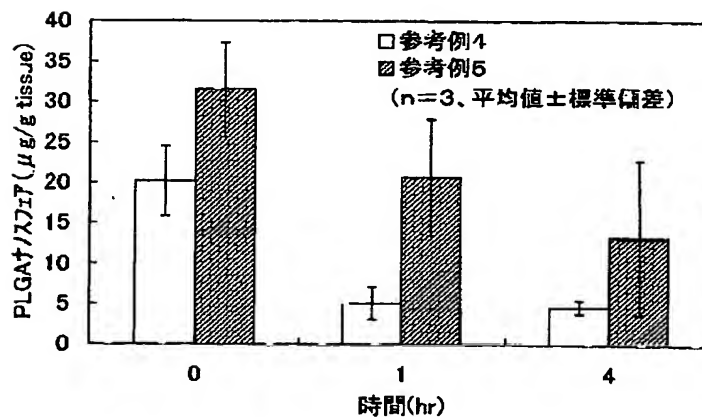
【図2】図2は、ナノスフェアの肺内滞留性を示すものである。

【図3】図3は、エルカトニン封入ナノスフェアの経肺投与後の血漿中カルシウム低下のプロファイルを示すものである。

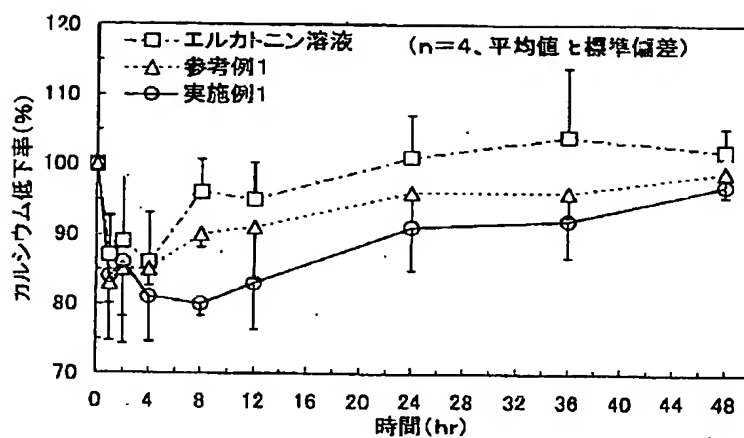
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4C076 AA65 BB27 CC30 EE24H
EE24M EE30H EE30M EE30N
FF32 FF34 FF68
4C084 AA03 BA44 DB31 MA13 MA38
MA56 NA10